Iranian Journal of Animal Science Research
Homepage: https://ijasr.um.ac.ir/

Research Paper
Vol. 14, No. 1, Spring 2022, p. 131-146

Evaluation of Probiotic Properties of Lactic Acid Bacteria Isolated from the Gut of Honeybees *Apis mellifera*

Samira Toutiaee[1], Naheed Mojgani[2]*, Naser Harzandi[3], Mojtaba Moharrami[4], Ladan Mokhberalsafa[4]

Received: 24-01-2021
Revised: 09-12-2021
Accepted: 13-12-2021
Available Online: 07-06-2022

How to cite this article:
Toutiaee, S., N. Mojgani, N. Harzandi, M. Moharrami and L. Mokhberalsafa. 2022. Evaluation of Probiotic Properties of Lactic Acid Bacteria Isolated from the Gut of Honeybees *Apis mellifera*. Iranian Journal of Animal Science Research 14(1):131-146.
DOI:10.22067/ijasr.2021.68076.1004

Introduction: European honey bees *(Apis mellifera*) are the most important pollinator insects that play vital role in maintenance of all most all life forms on earth. However, over the last decade major concerns have raised due to decline in the population of these insect species. A variety of factors have been responsible for these concerns of which the most important is honey bee bacterial diseases like Nosemosis (Nosema), American and European foulbrood diseases. While, overuse of antibiotics utilized for the treatment and control of these diseases has resulted in the emergence of antibiotic resistant strains of these pathogens. Probiotics have been considered a suitable substitute of antibiotics in human and animals. In last several years, lactobacillus species isolated from honeybees have been considered of significance in enhancing the life span of honeybees by reducing the incidence of bacterial and viral infections in these tiny insects. Among the isolated microbes in the gut of honeybees, Lactic Acid Bacteria (LAB) are of utmost importance showing direct impacts on the health of their host by modulating the gut microbial flora and are termed as Probiotic bacteria.

The objective of this research was to isolate and identify LAB from different parts of the intestinal tract of honeybees *Apis mellifera* and to characterize their probiotic properties.

Materials and Methods: Twenty-four honeybees collected from the hives located in the city of karaj were analyzed for the presence of LAB species. The stomach contents of honeybees were inoculated into MRS broth, incubated at 37ºCfor 48 hrs. The obtained colonies were purified and identified to species levels phenotypically and geno-typically. Hemolytic activity and sugar fermentation reactions of the isolates were recorded and later subjected 16SrRNA sequencing using a pair of universal primers. The identified isolates were evaluated for their viability in acidic conditions at pH 2.5, 3.0, 4.0 and 6.5 at different time intervals. Bile resistance of the isolates was tested by culturing the isolates in the presence of different concentrations of the said salts (0.5, 0.7 and 1%). Survival of LAB isolates in simulated gastric and intestinal conditions containing different enzymes and bile salts, antibacterial spectrum against a number of gram positive and gram-negative pathogens by agar well diffusion assay, and their *in vitro* colonization ability (aggregation, co-aggregation and hydrophobicity percentages) were evaluated. The results were analyzed statistically.

Results and Discussion: Twenty nine gram positive, catalase negative and non-hemolytic colonies were isolated from 24 honeybee samples. Among these, only 7 colonies showed enhanced antibacterial activity and were selected for further studies. Based on phenotypic characteristics, sugar fermentation reactions and 16S rRNA sequencing the isolates were identified as *Lactobacillus acidophilus (1), Lacticaseiobacillus casei, Lactiplantibacillus plantarum (2), Lactobacillus apis (1), Enterococcus faecium* (1) and *Pediococcus acidilactici* (1). During probiotic characterizations, the identified isolates were shown to retain their viability in acidic

1-PhD student, Department of Microbiology, Islamic Azad University, Karaj, Iran.
2-Professor, Razi Vaccine and Serum Research Institute-Agricultural Research, Education and Extension Organization, Iran.
3-Assistant Professor, Department of Microbiology, Islamic Azad University, Karaj, Iran.
4-Assistant Professor, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Iran.
*Corresponding Author Email: n.mojgani@rvsri.ac.ir

conditions and resisted pH 2.5, 3 and 4 for more than 4 hrs. However, slight decrease in viability at pH 2.5 and 3.0 was observed, compared to pH 4.0 and above. All isolates appeared bile resistant and tolerated all used concentrations of bile salts during 8 hrs of incubation. Survival rate of the isolates in simulated intestinal conditions was significantly ($p<0.05$) greater compared to simulated gastric conditions indicating greater stability of the isolates to alkaline conditions rather than to acidic conditions. *L.acidophilus* and *E.faecium* showed least resistance in gastric conditions and their growth rate was decreased more than 50% under said conditions. In contrast, the growth rate of these two isolates was highest in simulated intestinal conditions *as* they resisted these conditions for more than 24 hours. The isolates demonstrated antibacterial affect against a number of tested pathogens including *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis and Streprtococcus mutans.* The auto-aggregation, and cell surface hydrophobicity percentages of *L.casei* appeared highest compared to other tested Lactic Acid bacteria in study ($p<0.05$), while, *L.apis* showed the highest co-aggregation with *S.typhi* strain. *P.acidilactici* possessed the least auto-aggregation (46%), co-aggregation (10%) and hydrophobicity (43%) percentage. Auto-aggregation ability appeared directly related to hydrophobicity percentages and isolates showing high aggregation ability also showed high hydrophobicity %.

Conclusions: In conclusion, honeybee gut appeared a reservoir of LAB with probiotic potential. It is suggested that further studies should be conducted in order to determine the health benefits of these LABs in honeybees, with especial emphasis on their ability to prevent honeybee diseases.

Keywords: Aggregation and co-aggregation, Antibacterial activity, Colonization, Honeybees, Probiotic.

نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
Homepage: https://ijasr.um.ac.ir/

مقاله پژوهشی

ارزیابی خصوصیات پروبیوتیکی باکتری‌های اسید لاکتیک جداشده از دستگاه گوارش زنبور های عسل *Apis mellifera*

سمیرا طوطیایی[۱]، ناهید مژگانی*[۲]، ناصر هرزندی[۳]، مجتبی محرمی[٤]، لادن مخبرالصفا[٤]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۱/۰۵
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۰۹/۱۸
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۹/۲۲

طوطیایی، س.، ن. مژگانی، ن. هرزندی، م. محرمی، و ل. مخبرالصفا. ۱۴۰۱. ارزیابی خصوصیات پروبیوتیکی باکتری‌های اسید لاکتیک جداشده از دستگاه گوارش زنبور های عسل *Apis mellifera* . پژوهشهای علوم دامی ایران ۱۴(۱): ۱۴۶-۱۳۱.

چکیده

میکروارگانیسم‌های موجود در روده حشرات نقش مهمی را در سلامت و بهداشت حشرات دارند. این میکروارگانیسم‌ها بخصوص باکتری‌های اسید لاکتیک و *باسیلوس*ها پس از مصرف در سلامتی میزبان اثرات مفیدی از طریق برقراری تعادل در میکروفلور روده ای ایجاد می‌کنند. در این تحقیق، باکتری‌های اسید لاکتیک از قسمت‌های مختلف دستگاه گوارش زنبور عسل جداسازی شده و جدایه‌های بدست آمده با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی (رنگ آمیزی گرم، تست کاتالاز و تخمیر قند) و مولکولی 16S rRNA در حد جنس و گونه شناسایی شدند. براساس نتایج بدست آمده، روده زنبور عسل حاوی *لاکتوباسیلوس، انتروکوکوکوس، پدیوکوکوس* بود و جدایه‌های شناسایی شده شامل لاکتوباسیلوس *اسیدوفیلوس* *Lactobacillus acidophilus* (یک جدایه)، *لاکتوباسیلوس کازیی* *Lactobacillus casei* (یک جدایه)، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* *Lactobacillus plantarum* (دو جدایه)، *لاکتوباسیلوس آپیس* *Lactobacillus apis* (یک جدایه)، *پدیوکوکوس اسیدی لاکتیس* *Pediococcus acidilactici* (یک جدایه) و *انتروکوکوس فاسیوم* *Enterococcus faecium* (یک جدایه) بودند. تمامی سویه‌های شناسایی شده جهت خصوصیات پروبیوتیکی مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که سویه های مذکور قادر به تحمل pH اسیدی (۲،۲/۵) و غلظت بالای نمک صفرا (۱، ۰/۷ و ۰/۵ ٪) بوده و دارای اثر ضد میکروبی بر علیه پاتوژن‌های بودند. در مقایسه با شرایط معده ، باکتری‌های اسید لاکتیک آزمایش شده درصد زنده مانی بالاتری در شرایط شبیه سازی شده روده‌ای را نشان دادند. *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* ۲ و *لاکتوباسیلوس آپیس* به طور معنی داری بیشترین مقاومت را به ترتیب به شرایط شبیه سازی شده معده و روده نشان دادند. نتایج حاصل از تجزیه آماری نشان داد *لاکتوباسیلوس کازیی و لاکتوباسیلوس آپیس* بیشترین درصد تجمعی و آبگریزی را دارا بودند. مطالعه حاضر بیانگر حضور باکتری های اسید لاکتیک با خصوصیات پروبیوتیکی در دستگاه گوارش زنبور عسل است. باکتری های جداشده را می‌توان جهت استفاده در انسان، دام و همچنین زنبور عسل بعنوان پروبیوتیک پیشنهاد کرد.

واژه های کلیدی : اثر ضد میکروبی، ، اگریگیشن و کو اگریگیشن، پروبیوتیک، چسبندگی به سلول های اپیتلیال، زنبور عسل

مقدمه

باکتری های تولید کننده اسید لاکتیک (LAB) گروهی از باکتری

۱- دانشجوی دکتری،گروه میکروبیولوژی ، دانشگاه آزاد اسلامی،کرج، ایران.
۲- استاد موسسه تحقیقات واکسن وسرم سازی رازی-سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی،کرج، ایران.
۳- استادیار گروه میکروبیولوژی ، دانشگاه آزاد اسلامی،کرج، ایران.
۴- استادیار موسسه تحقیقات واکسن وسرم سازی رازی ، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی ، ایران.
(*- نویسنده مسئول: (Email: n.mojgani@rvsri.ac.ir

DOI: 10.22067/ijasr.2021.68076.1004

های گرم مثبت میله‌ای شکل بدون اسپوری هستند که اسید لاکتیک را به‌عنوان محصول عمده نهایی تخمیر کربوهیدرات‌ها تولید می‌کنند (Audisio *et al*., 2011). این باکتری‌ها معمولا به صورت هم‌زیست در سیستم گوارش انسان، حشرات و حیوانات، ساکن هستند. گونه‌های خانواده *کارنوباکتریوم*، *انتروکوکوس*، *لاکتوباسیلوس*، *لاکتوکوکوس*، *لوکونوستوک*، *اوئنوکوکوس*، *پدیوکوکوس*، *استرپتوکوکوس*، *تترانژنوکوکوس*، *واگوکوکوس* و *ویزسلا* با غذاها مرتبط هستند. از بین خانواده LAB، *لاکتوباسیلوس‌*ها بعنوان باکتری‌های مفید و عضو اصلی پروبیوتیک شناخته شده‌اند. نقش این باکتری‌ها در درمان و کنترل بیماری‌های دام و انسان سابقه طولانی دارد و از مدتها قبل از این باکتری‌ها به عنوان پروبیوتیک و افزایش دهنده کمیت و کیفیت محصولات دامی استفاده شده است و عموماً به عنوان غذای با کیفیت امن (GRAS, Generally Recognized as Safe) شناخته می شوند (FAO/WHO, 2001).

در سال های گذشته مطالعات بسیاری نشان دهنده حضور LAB در دستگاه گوارش زنبور عسل بوده است. زنبورهای عسل دارای میکروبیوتای متنوعی در محصول عسل خود هستند، که حاصل مصرف گرده گل‌ها و شهد و نیز ارتباط آن‌ها با زنبورهای عسل دیگر است (Vásquez *et al*., 2012). جیره غذایی یکی از مهم ترین عوامل مؤثر در جمعیت فلور حشرات است. تفاوت در منبع شهد نیز در جنس باکتریایی و فلور معده زنبور عسل تأثیر دارد. همچنین فعالیت زنبوران عسل در کندو می تواند در *لاکتوباسیل‌*ها و سویه‌های باکتریایی دستگاه گوارش آن‌ها اثر داشته باشد (Tajabadi *et al*., 2011). در قسمت فوقانی ناحیه معدی-روده‌ای زنبورهای عسل گونه‌های *لاکتوباسیلوس* که توانایی کلونیزه شدن در سطح موکوسی دوازدهه را دارند، شناسایی و جداسازی شده است که خواص سودمند پروبیوتیکی داشتند. گیلیم (۱۹۹۷) انواع گونه‌های *انترکوکوس* شامل *انترکوکوس فاسیوم* و *فکالیس* را نیز به عنوان پروبیوتیک از زنبور جدا سازی نموده و مورد بررسی قرار داده است (Gilliam and Prest, 1987).

طبق گزارشات گذشته ، محققین با استفاده از LAB جداسازی شده از زنبورعسل توانستند نقش آنها را در کنترل بیماری‌های باکتری-های بویژه لوک آمریکائی و لوک اروپائی و نوزموزیس را ارائه دهند (Sabaté et al., 2012; Vasquez et al., 2009). در تحقیقات دیگری در ایران، قیصری و بهجتیان (۱۳۹۴) در زمینه اثرات تغذیه سطوح مختلف اسید استیک، پروبیوتیک، اکسی تتراسیکلین و نئومایسین بر جمعیت باکتریایی کلی فرم و *لاکتوباسیل* در شفیره زنبور عسل نشان دادند که استفاده از پروبیوتیک می تواند موجب افزایش جمعیت زنبورها شود (Gheisari and Behjatian Esfahani, 2015). زنبورهای عسل امروزه در سرتاسر جهان در معرض استرس‌های گوناگون (آب و هوایی، تغذیه ای و یا آفات و بیماری ها) هستند که این امر منجر به بروز بیماری‌های ویروسی، باکتریایی و انگلی شده و سبب اختلال فروپاشی کلنی (CCD Colony Collapse Disorder) می شود. مطالعات نشان داده است که استفاده از مکمل‌های پروبیوتیکی در زنبورهای عسل سبب استقرار این باکتری‌ها در دستگاه گوارش زنبور عسل شده و منجر به بهبود شرایط سلامت زنبور بر علیه بیماری‌زاها می‌شود، بنابراین جداسازی و شناسایی این عوامل ضروری به نظر می‌رسد (Olofsson *et al*., 2011; Vasquez *et al*., 2009). هدف از این پژوهش جداسازی باکتری های مفید دستگاه گوارش زنبوران عسل در استان البرز و بررسی شاخص های پروبیوتیکی جدایه ها می باشد.

مواد و روش‌ها

جمع آوری نمونه‌های زنبورعسل

برای انجام آزمایشات ، نمونه برداری از ۲۴ زنبور کارگر، نر و نوزادان سالم از کندوهای موجود در موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی کرج در فصل بهارانجام گرفت. زنبور های جمع آوری شده در فالکون های هاوی یخ به آزمایشگاه منتقل و پس از شستشو با بافر استریل در ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا انجام آزمایشات در یخچال نگهداری شدند. دستگاه گوارش زنبور عسل با استفاده از پنس آزمایشگاهی استریل از بدن زنبور ها بیرون کشیده و در ۱۰ میلی لیتر نرمال سالین مخلوط شده (Audisio *et al*., 2011).

جداسازی باکتری‌های اسید لاکتیک از دستگاه گوارش زنبور عسل

نمونه‌های دستگاه گوارش زنبورها به همراه نرمال سالین برای غنی سازی و رشد *لاکتوباسیل‌*ها به محیط DeMan Rogosa and Sharpe (MRS) مایع (مرک آلمان) منتقل شدند. نمونه ها به مدت۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در شرایط بی‌هوازی گرمخانه گذاری شدند. پس از رشد باکتری‌ها در محیط مایع، رقت‌های مختلف تهیه و۱ میلی لیتر از مایع به ۹ میلی لیتر بافر نرمال اضافه شد و پس از مخلوط کردن رقت‌های بیشتری از آن تهیه گردید. یک میلی‌لیتر از رقت‌های تهیه شده روی پلیت‌های MRS آگار روی سطح پلیت ریخته و به آرامی با میله شیشه ای استریل در سطح پلیت پخش گردید. به منظور جلوگیری از رشد کپک و مخمر در محیط کشت سیکلوهگزامید به میزان ۰/۱ میلی گرم در میلی لیتر اضافه شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. جهت نگهداری طولانی مدت، ۵۰۰µl از کشت تازه جدایه‌ها در محیط مایع به ویال‌های ۲ میلی لیتری منتقل و گلیسرول استریل به میزان غلظت نهایی ۲۰٪ به آن اضافه گردید. این ویال‌ها در ۲۰- درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ الی ۴۸ ساعت قرار داده سپس در فریزر۸۰- درجه سانتیگراد

برای طولانی مدت نگهداری شدند.

شناسایی فنوتیپی جدایه ها

تشخیص LAB با استفاده از محیط های کشت افتراقی و اختصاصی و آزمون های بیوشیمیایی انجام شد. کلنی‌های خالص انتخاب شده بر اساس رنگ‌آمیزی گرم و از نظر شکل ظاهری، واکنش گرم و تست کاتالاز بررسی شدند. تمام جدایه‌های گرم مثبت براساس تخمیر کربوهیدراتها در سطح گونه مورد شناسایی قرار گرفتند (Kandler and Weiss, 1986)

شناسایی جدایه‌ها با استفاده از روش مولکولی16SrRNA

نمونه های اسید لاکتیک جدا شده با استفاده از روش مولکولی در حد جنس و گونه شناسایی و تایید گردید. استخراج DNA هر نمونه با استفاده از کیت استخراج DNA (شرکت سیناژن، ایران) انجام شد. لیست و توالی پرایمرهای عمومی، مورد استفاده در انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱- پرایمرهای عمومی مورد استفاده جهت شناسایی باکتری های اسید لاکتیک

Table 1- Universal primer pair used for identification of LAB isolates

منبع	طول قطعه	توالی	پرایمر ها
(۲۱)	bp۱۵۰۰	5’AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3’	F۲۷
		5’-GGTTACCTTGTTACGACTT-3’	R۱۴۹۲

برنامه PCR شامل دمای دناتوراسیون اولیه ۹۵ درجه سیلسیوس و مدت زمان ۵ دقیقه بود. سپس سی سیکل شامل ۱ دقیقه در دمای ۹۴ درجه ، ۱ دقیقه در دمای ۵۰ درجه و ۱ دقیقه و ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس انجام شد. پس از این مراحل نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به منظور تکمیل سنتز DNA نگه داشته شدند. محصول PCR بر روی ژل آگارز ۰/۸ ٪ درصد الکتروفورز و مشاهده ی باند ۱۵۰۰جفت بازی به معنی تعلق باکتری به جنس *لاکتوباسیلوس* بود. پس از تخلیص باندهای بدست آمده جهت سکانس به شرکت انگلیسی Biosunce فرستاده شدند. تمامی توالی بدست آمده با برنامه Blast: blast.ncbi.nim.nih. gov در حد جنس تایید و ثبت شدند.

فعالیت همولیتیک

در این بررسی، لیز گلبول‌های قرمز خون گوسفندی با کشت میکروارگانیسم بر روی محیط کشت آگاردار حاوی خون گوسفند انجام شد. جدایه‌ها بر روی محیط کشت آگار خون‌دار (محیط پایه حاوی ۷٪ خون گوسفندی دفیبرینه) به روش خطی کشت داده و سپس به صورت وارونه در دما و شرایط مناسب گرمخانه‌گذاری شدند. پس از پایان مدت گرمخانه‌گذاری، پلیت‌ها از نظر وجود هاله شفاف در اطراف کلنی بررسی شدند.

انواع همولیزدر محیط کشت

همولیز آلفا: وجود هاله تاریک متمایل به سبز در زیر کلونی در آگار نشان دهنده همولیز آلفا است که شامل همولیز ناقص و یا جزئی می‌باشد. عامل اصلی ایجاد همولیز آلفا تولید پراکسیداز در محیط توسط باکتری است.

همولیز بتا: وجود هاله شفاف نشان دهنده واکنش مثبت و این نوع همولیز است که به علت لیز کامل گلبول‌های قرمز ایجاد می‌شود. عامل ایجاد بتا همولیز تولید همولیزین در محیط است.

همولیز گاما: اگر میکروارگانیسمی منجر به ایجاد همولیز نشود به عنوان گاما همولیز شناخته می‌شود. آگار در اطراف کلونی این ارگانیسم‌ها بدون تغییر باقی می‌ماند.

بررسی ویژگی های پروبیوتیکی جدایه ها

بررسی خاصیت ضد میکروبی باکتری‌های جدا شده بر علیه باکتری‌های بیماری‌زا

فعالیت ضد میکروبی جدایه‌ها در برابر اشریشیاکلای ATCC۱۱۷۷۵ ، انتروکوکوس فکالیس IBRC-M-۱۰۷۴۰، کلبسیلا نومونیه PTCC۱۰۵۳، لیستریا مونوسایتوژنز RTCC۱۲۹۸، سودوموناس ائروژینوزا ATCC۲۵۶۶۸، سالمونلا پارا تیفی IBRC-M۱۰۶۶۸، استافیلوکوکوس اورئوس RTCC۱۱۱۲، استرپتوکوکوس موتانس IBRC-M۱۰۶۸۲، با استفاده از روش چاهک مورد ارزیابی قرار گرفت. مقادیر مورد استفاده در این آزمون برای جدایه-ها و پاتوژن‌ها نیم مک فارلند تعیین گردید (Felis *et al*., 2007).

بررسی مقاومت به اسید

به منظور بررسی مقاومت LAB به اسید، از محیط مایع MRS استریل، که به کمک اسیدکلریدریک ۱۰نرمال و سود (NaOH) ۱۰ نرمال، pH آن به ترتیب به۲ ، ۲/۵، ۳، ۴ و ۶/۵ رسانده شده بود، استفاده گردید. رشد باکتری در زمان های صفر، ۱، ۲، ۳ و ۴ ساعت، در طول موج ۶۲۰ نانومتر به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر بررسی شد (Ripamonti *et al*., 2011).

بررسی مقاومت به نمک صفرا

اساس روش بررسی مقاومت و میزان کاهش رشد میکروارگانیسم در حضور نمک‌های صفراوی است. این ارزیابی جدایه‌های مورد نظر با کمی تغییر در روش واکر و گیلیلند (۱۹۹۳) انجام گرفت. میزان رشد براساس جذب نوری در زمان‌های صفر ، ۲، ۴ و ۸ ساعت در طول موج ۶۵۰ نانومتر در غلظت‌های ۰/۵ ، ۰/۷ و ۱٪ نمک صفرا (سیگما، UK) گزارش شد (Ripamonti *et al*., 2011).

مقاومت نسبت به شرایط معده‌ای

ارزیابی مقاومت *لاکتوباسیل*‌های جدا شده نسبت به شرایط معده‌ای طبق روش بومر و همکاران (۱۹۹۲)، با اندکی تغییر انجام گرفت (۳). محیط شبیه سازی شده شیره معدی با pH ۳، با اضافه نمودن پپسین (۳ mg/L)، لیزوزیم (۰/۱ mg/L)، صفرا (۰/۰۵ mg/L) و ۰/۵ ٪ کلرید سدیم آماده شد. به میزان ۱٪ V/V از سوسپانسیون باکتریایی جدایه‌ها با رقت نیم مک فارلند به محیط شیره معده افزوده شد و در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. زنده مانی باکتری‌های جدا شده بعد از ۰، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ دقیقه به روش پورپلیت بررسی شد و تعداد باکتری‌های زنده براساس cfu/mL گزارش شدند. زنده مانی باکتری‌ها طبق معادله (Audisio *et al*., 2011) محاسبه شدند.

R=Average of cells at 10 min interval/Average of cells at 0min

مطابق فرمول ، R برابر و یا بیشتر از یک نشاندهنده تحمل باکتری به شرایط معده و رشد آن می‌باشد، درحالیکه اگر این مقدار ۰/۵ باشد، به معنای از بین رفتن ۵۰ ٪ باکتری‌ها می‌باشد.

زنده مانی در شرایط روده‌ای

ارزیابی زنده مانی *لاکتوباسیل*‌های جدا شده در محتوای روده فوقانی، طبق روش توصیف شده در مقاله چارتریس و همکاران (۱۹۹۸) انجام شد (Charteris *et al*., 1998). محیط شبیه سازی شده روده فوقانی با اضافه نمودن ۱g/L نمک صفرا در محلول بافر فسفات یک مولار با pH ۸ شامل آنزیم پانکراتیک با غلظت نهایی۱ g/L آماده شد. سوسپانسیون باکتریایی جدایه‌های مورد مطالعه با غلظت ۱ ٪ V/V به محیط شبیه سازی شده روده فوقانی افزوده شد و در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. در صد زنده مانی باکتری‌های مورد آزمایش در ۰ ، ۴ ، ۸ ، ۱۲ و ۲۴ساعت با استفاده از فرمول ذکر شده در بالا، اندازه گیری شد.

آزمون تجمعی و کمک تجمعی

آزمون تجمعی (اگریگیشن) براساس روش ذکر شده توسط کاس و همکارانش (۲۰۰۳) انجام شد. میزان درصد اگرگیشن با استفاده از فرمول $100\times1-(A_1/A_0)$ که A_1 جذب به دست آمده از زمان های ۱الی ۵ ساعت است و A_0 جذب به دست آمده در زمان صفراست. همچنین اتصال باکتری‌ها به هم با استفاده از رنگ آمیزی گرم و به وسیله‌ی میکروسکوپ نوری بررسی شد (Kos *et al*., 2003).

آزمون کمک تجمعی (کواگریگیشن) نمونه‌های ذکر شده، با پاتوژن سالمونلا طبق روش دل ری (۲۰۰۰) مورد بررسی قرار گرفت. رسوب باکتری‌های کشت شده از شب قبل با استفاده از سانتریفیوژ در ۵۰۰۰rpm به مدت ۱۵ دقیقه به دست آمد. پس از دوبار شستشوی رسوب در PBS رقت 10^8 CFU mL^{-1} از باکتری‌ها ایجاد شد. پس از ترکیب حجم‌های مساوی از باکتری پروبیوتیک و پاتوژن (۲ میلی لیتر از هر باکتری) و ورتکس به مدت ۱۵ ثانیه در دمای ۲۵درجه سانتیگراد قرار داده و همانند روش خواندن جذب در تجمعی، جذب نمونه ها در ۶۰۰ نانومترخوانده شد. کنترل حاوی ۴ میلی لیتر از هریک از باکتری‌ها به تنهایی است و در نهایت درصد کمک تجمعی با استفاده از معادله‌ی (Axelsson and Ahrné, 2000) محاسبه شد.

$$100\times(A_X+A_Y/2)-A(X+Y)A_X+A_Y/2$$

که در آن x وy نشان دهنده‌ی جذب هریک از دو نمونه در تیوپ های کنترل است و (x+y) جذب ترکیب دو باکتری با هم است. همچنین اتصال دو باکتری پروبیوتیک و پاتوژن به یکدیگر از طریق رنگ آمیزی گرم نیز بررسی شد.

اندازه گیری میزان آبگریزی

هیدروفوبیستی یا آبگریزی باکتری‌های مورد نظر با استفاده از xylene با اندکی تغییرات انجام شد (TR, 2018). رسوب باکتری‌ها با استفاده از سانتریفیوژ در دور ۵۰۰۰ و به مدت ۱۵ دقیقه از کشت شبانه بدست آمد. سپس رسوب بدست آمده به وسیله ی بافر فسفات پتاسیم با pH ۶/۵ شستشو و پس از انحلال مجدد در ۵ میلی لیتراز همین بافر، جذب آن در A_{620} اندازه گیری شد. پس از اضافه کردن ۱ میلی لیتر xylene به محلول، به مدت ۲ دقیقه وورتکس شد تا فازها از هم جدا شوند. سپس فاز آبی رویی را جدا کرده و جذب آن در A_{620} اندازه گیری شد. در نهایت درصد آبگریزی با استفاده از معادله (Beumer *et al*., 1992) محاسبه شد.

$$\text{درصد آبگریزی} = ۱۰۰ \times \frac{(\text{جذب نوری قبل از مخلوط کردن}-\text{جذب نوری پس از مخلوط کردن})}{\text{جذب نوری قبل از مخلوط کردن}}$$

تحلیل آماری:

تحلیل آماری با کمک نرم افزار SPPS 20 انجام شد و همچنین جهت ترسیم نمودارها از اکسل استفاده شد. تمامی تست‌ها با دو بار تکرار انجام شد و تفاوت معنی دار با کمک نرم افزار SPSS و مقایسه میانگین به روش چند دامنه‌ای آزمون دانکن در سطح P< ۰/۰۵ مشخص گردید.

نتایج و بحث

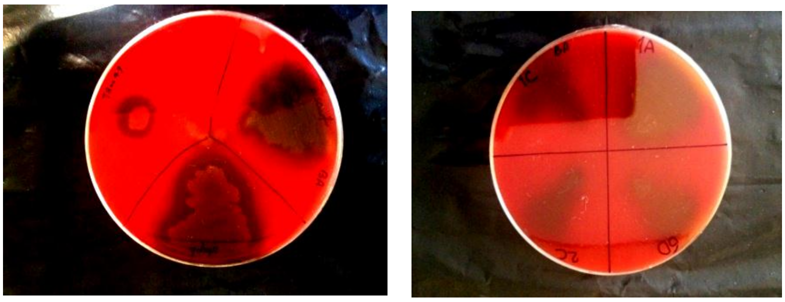
در یک دهه اخیر نقش پروبیوتیک ها در زنبور عسل خیلی پررنگ شده است و مطالعات نشان داده که استقرار LAB در دستگاه گوارش زنبور عسل منجر به بهبود شرایط گوارش و غلبه بر جمعیت میکروب-های بیماریزا در این حشره می‌باشد. در این پژوهش ما جدایه های LAB را از دستگاه گوارش زنبور عسل جداسازی و شناسایی کردیم.

جداسازی و شناسایی باکتری ها

گزارشات زیادی نشان داده که روده زنبورهای عسل حاوی ۱٪ مخمر ، ۲۷٪ باکتری‌های گرم مثبت شامل گونه های *لاکتوباسیلوس*، *استرپتوکوکوس*، *باسیلوس*، *کلستردیوم* ،و۷۰٪ باکتری‌های گرم منفی یا گرم متغیر مانند *ایشیرشیاکلی*، *سیتروباکتر*، *انتروباکتر کلبسیلا*، *سودوموناس*، *فلاوباکتریوم* و *پروتیوس* می باشد. همچنین تاج آبادی و همکاران (۲۰۱۳) در تحقیقی نشان دادند که عمده باکتری جداسازی شده از زنبورعسل کوچک از گروه باکتری‌های گرم مثبت هستند. همسو با نتایج تاج آبادی و همکاران ما نیز باکتری‌های گرم مثبت زیادی را از روده زنبور عسل *Apis mellifera* جداسازی کردیم. طبق نتایج از ۲۴ نمونه زنبورعسل (دستگاه گوارش) ۱۳۶ نوع کلنی‌در پلیت‌های حاوی MRS آگار دیده شد، پس از تهیه لام و رنگ آمیزی گرم، از ۱۳۶ کلنی، ۸۷ جدایه باسیل‌های گرم مثبت مشاهده شدند که به صورت تکی، دوتایی، زنجیره‌های کوتاه و یا مجتمع قرار گرفته بودند. البته از بین ۸۷ کلنی گرم مثبت تنها ۲۹ جدایه کاتالاز منفی و همولیز منفی بودند و جهت مطالعات بعدی انتخاب شدند.

نتایج فعالیت همولیتیک جدایه ها

یکی از خصوصیات مورد نیاز برای پروبیوتیک بودن جدایه‌ها، ایمن بودن آن‌ها برای مصرف نسانی می‌باشد که مهمترین شاخص ایمنی این جدایه نداشتن خصوصیات همولیتیک و یا همولیز بتا آن‌ها می‌باشد. در این تحقیق نیز جدایه‌های فاقد عملکرد همولیز بتا جهت مطالعات بعدی انتخاب شدند (شکل ۲).



شکل ۲– بررسی فعالیت همولیز؛ نشاندهنده عدم همولیز در جدایه‌های منتخب (B)، : نمونه کنترل دارای فعالیت همولیز(A)

Figure 2 – Hemolytic activity; A) controll samples showing beta hemolysis B) isolates showing no hemolysis

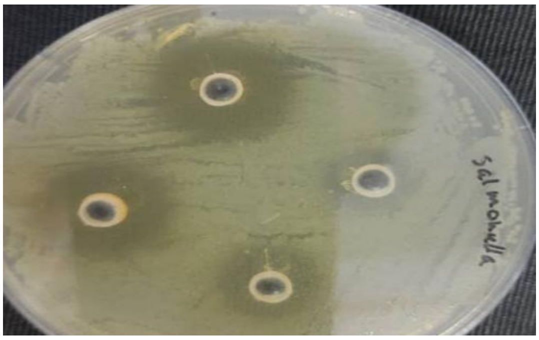
نتایج فعالیت ضد میکروبی جدایه‌ها

در این تحقیق جدایه‌های منتخب از نظر فعالیت آنتاگونیستی در برابر تعدادی از پاتوژن‌های گرم منفی و مثبت با استفاده از روش حفره ای مورد ارزیابی قرار گرفتند (شکل ۳). نتایج فعالیت ضد میکروبی LAB جدا شده از دستگاه گوارش زنبور عسل در جدول ۲ نشان داده شده است. همان طور که مشاهده می‌شود همه جدایه‌ها مورد بررسی دارای فعالیت ضد میکروبی متفاوتی در برابر پاتوژن‌های گرم مثبت و گرم منفی بودند. تفاوت معنی‌دار در اثر ضدمیکروبی بین جدایه‌های مختلف مشاهده نشد.،تمامی حدایه ها بر علیه *اشریشیا کلی*، *انتروکوکوس فاسیوم*، *لیستریامونوسیتوژنز* و *استرپتوکوکوس میوتانس* فعالیت ضد میکروبی نشان دادند، و تنها لاکتوباسیلوس کازئی و *لاکتوباسیلوس آپیس* قادر به مهار *سالمونلا تیفی‌موریوم* نبودند. همچنین *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* بر علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* اثری نداشت.

برخلاف نتایج ما، در تحقیقی *انتروکوکوس فاسیوم* جدا شده از زنبور دارای خاصیت ضدمیکروبی برعلیه *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیاکلی* نبود، اما *لاکتوباسیلوس کازئی* دارای اثر ضدمیکروبی بر علیه *سالمونلا تیفی‌موریوم* بود (Audisio *et al.*, 2011). در تحقیقی دیگر نیز *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* جدا شده از زنبور دارای اثر ضدمیکروبی خوبی برعلیه *اشرشیاکلی*، *سالمونلا اپیدرمیدیس* و *کلستریدیوم بوتولینوم* بود (El-Sohaimy et al., 2020).

خاصیت ضد میکروبی LAB مربوط به انواعی از متابولیت‌ها از جمله باکتریوسین، دی استیل، اسیدهای آلی مانند اسید لاکتیک و پراکسید هیدروژن می باشد (O'Bryan *et al.*, 2014). با توجه به خاصیت ضدمیکروبی این باکتری‌ها، می توان از آن‌ها به عنوان نگهدارنده‌های طبیعی در مواد غذایی نیز استفاده نمود. در سالیان اخیر که بیماریهای زنبورعسل به عنوان یکی از عوامل تهدید کننده صنعت زنبورداری کشورها مطرح است و هر ساله تعداد بسیار زیادی از کلنی‌های زنبورعسل در اثر بیماری‌ها از بین می‌روند، استفاده از داروها و مواد شیمیایی گرچه منجر به کنترل نسبی بیماری‌ها شده است، اما

مشکلاتی در مصرف فراورده های زنبورعسل ایجاد نمودهاند. بنابراین احتمالا بتوان از باکتری های اسیدلاکتیک جداسازی شده از زنبورعسل در کنترل بیماری‌ها استفاده نمود.



شکل ۳– آزمون فعالیت ضد میکروبی جدایه ها علیه پاتوژن ها با روش حفره‌ای

Figure 3 – Antibacterial activity demonstrated by the isolates against pathogens in agar well diffusion assay

جدول ۲– نتایج خواص ضد میکروبی جدایه‌های اسید لاکتیک بر علیه باکتری های بیماریزا (میلی متر)

Table 2- Antibacterial activity of lactic acid bacteria against pathogenic bacteria (mm)

باکتری شاخص Indicator Strains	لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس *L. acidophilus*	لاکتوباسیلوس کازئی *L.casei*	لاکتوباسیلوس پلانتاروم ۱ *L.plantarum1*	لاکتوباسیلوس پلانتاروم ۲ *L.plantarum2*	لاکتوباسیلوس آپیس *L.apis*	پدیوکوکوس اسیدی لاکتیسی *Ped. acidilactici*	انتروکوکوس فاسیوم *E. faecium*
اشرشیاکلی *E.coli* ATCC11775	27 ± 10^{a}	21 ± 10^{a}	32 ± 12^{a}	15 ± 6^{a}	26 ± 12^{a}	15 ± 10^{a}	31 ± 10^{a}
انتروباکتر فاسیوم *E. faecalis* IBRC-M10740	28 ± 11^{a}	18 ± 6^{a}	16 ± 8^{a}	12 ± 7^{a}	15 ± 9^{a}	14 ± 7^{a}	21 ± 9^{a}
لیستریا مونوسیتوژنز *L.monocytogenes* RTCC1298	24 ± 12^{a}	28 ± 5^{a}	26 ± 12^{a}	18 ± 10^{a}	19 ± 8^{a}	15 ± 7^{a}	28 ± 12^{a}
سودوموناس ائروژینوزا *Ps.aerouginosa* ATCC 25668	14 ± 9^{a}	14 ± 4^{a}	19 ± 9^{a}	17 ± 7^{a}	16 ± 7^{a}	15 ± 9^{a}	٠
سالمونلا پارا تیفی *S.typhimurium* RTCC 1679	28 ± 8^{a}	٠	12 ± 5^{a}	14 ± 6^{a}	٠	29 ± 11^{a}	27 ± 12^{a}
استافیلوکوکوس اورئوس *Staph. aureus* RTCC 1112	٠	24 ± 6^{a}	26 ± 7^{a}	24 ± 7^{a}	20 ± 5^{a}	18.3 ± 9^{a}	22 ± 10^{a}
استرپتوکوکوس موتانس *Strep.mutans* IBRC-M10682	28 ± 6^{a}	28 ± 10^{a}	25 ± 10^{a}	12 ± 5^{a}	15 ± 6^{a}	28 ± 11^{a}	18 ± 10^{a}
کلبسیلا نومونیه *K.pneumoniae* PTCC 1053	12 ± 7^{a}	16 ± 3^{a}	18 ± 6^{a}	٠	19 ± 8^{a}	19 ± 6^{a}	16 ± 5^{a}

a,b حروف کوچک در هر ردیف نشاندهنده تفاوت معنی‌دار بین انواع جدایه‌ها می‌باشد (P<۰/۰۵)

Small alphabetical letters in the column shows significant differences between isolates ($p \leq 0.05$)

شناسایی مولکولی باکتری های اسید لاکتیک

از بین ۲۹ جدایه تنها ۷ جدایه خاصیت ضدمیکروبی بالاتری نسبت به دیگر جدایه نشان دادند و با استفاده از ژن 16S rRNA شناسایی شدند.استفاده از روش های مولکولی در حد جنس و گونه شناسایی

شدند. تمامی جدایه های یک باند ۱۵۰۰ باز در ژل آگارز نشان دادند (شکل ۴) که پس از سکانسیگ بعنوان *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، *لاکتوباسیلوس کازیی*، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* (۲سویه)، *لاکتوباسیلوس آپیس* ، *پدیوکوکوس اسیدی لاکتیسی* و *انتروکوکوس فاسیوم* شناسایی و ثبت شدند.

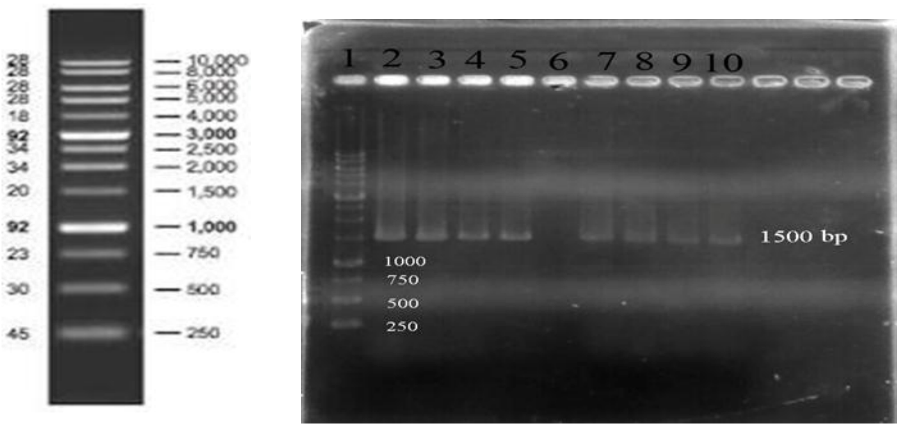
باکتری های اسید لاکتیک شناسایی شده به عنوان باکتری‌های پروبیوتیک انسانی و حیوانی نیز حائز اهمیت می‌باشند. LABبه عنوان مهمترین ساکنین روده انسان و پستانداران دیگر و حیوانات مهره‌دار گزارش شده است. همچنین تحقیقات انجام شده در ارتباط با فلور میکروبی زنبور عسل *Apis mellifera* نشان داده که به طور عمده فلور میکروبی این حشره از مخمر، باکتری‌های گرم مثبت مانند *لاکتوباسیلوس*، *باسیلوس* و گرم منفی مانند *انتروباکتر*، *اشرشیاکلی* و *سودوموناس* تشکیل شده است (Gilliam and Prest, 1987).

لاکتوباسیلوس و *انتروکوکوس* در این گروه قرار دارند که البته در فرآیند تخمیر و مواد غذایی نیز وجود دارند. این گروه از باکتری‌ها نه تنها برای مواد غذایی بلکه از جنبه سلامتی بخش بودن نیز دارای اهمیت می‌باشند (Naidu *et al*., 1999). همسو با نتایج ما، در مطالعات انجام شده در ایران (Nikooei *et al*., 1999)، از دستگاه گوارش زنبور عسل در ایران پنج سویه مختلف باکتری‌های *لاکتوباسیلوس* جداسازی شده شامل *لاکتوباسیلوس کونکی*، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس آپیس* بود. در تحقیقی مشابه نیز *لاکتوباسیلوس ژوهانسی* و *انتروکوکوس فاسیوم*، *انتروکوکوس فکالیس* و *لاکتوباسیلوس برویس* و *لاکتوباسیلوس کازئی* از دستگاه روده زنبور جدا شد (Audisio *et al*., 2011; Elzeini *et al*., 2020).

نتایج مقاومت به اسید

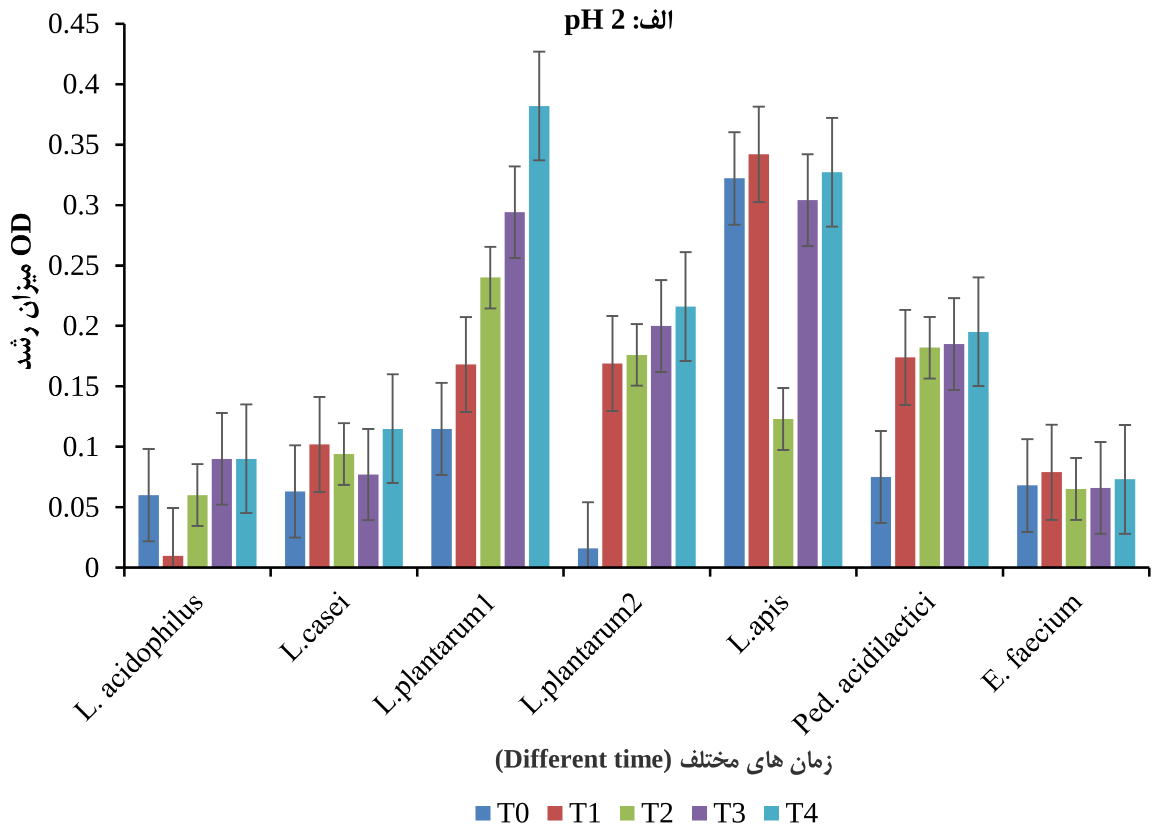
یکی از مهم‌ترین فاکتورهای انتخاب پروبیوتیک‌ها مقاومت به حامل‌های شیمیایی مثل اسیدها و نمک‌ها صفراوی موجود در دستگاه گوارش می‌باشد (Gibson *et al*., 2004). نشان داده شده است که باکتری‌های پروبیوتیکی به وسیله غذا و یا مولکول‌های موجود در دستگاه گوارش خاصیت بافری پیدا کرده و در شرایط فوق اسیدی قرار نمی‌گیرند (Sjovall, 1959; Gilliam and Prest, 1987). از آنجایکه میزان اسیدیته معده در صبح ناشتا حدود ۱ است و البته پس از هضم غذا به ۴/۵ می‌رسد، بنابراین یک پروبیوتیک مناسب باید تقریبا pH ۳ را تحمل کند (Liong and Shah, 2005). توانایی زنده‌مانی و رشد باکتری‌ها در pH های مختلف در شکل ۵ نشان داده شده است.

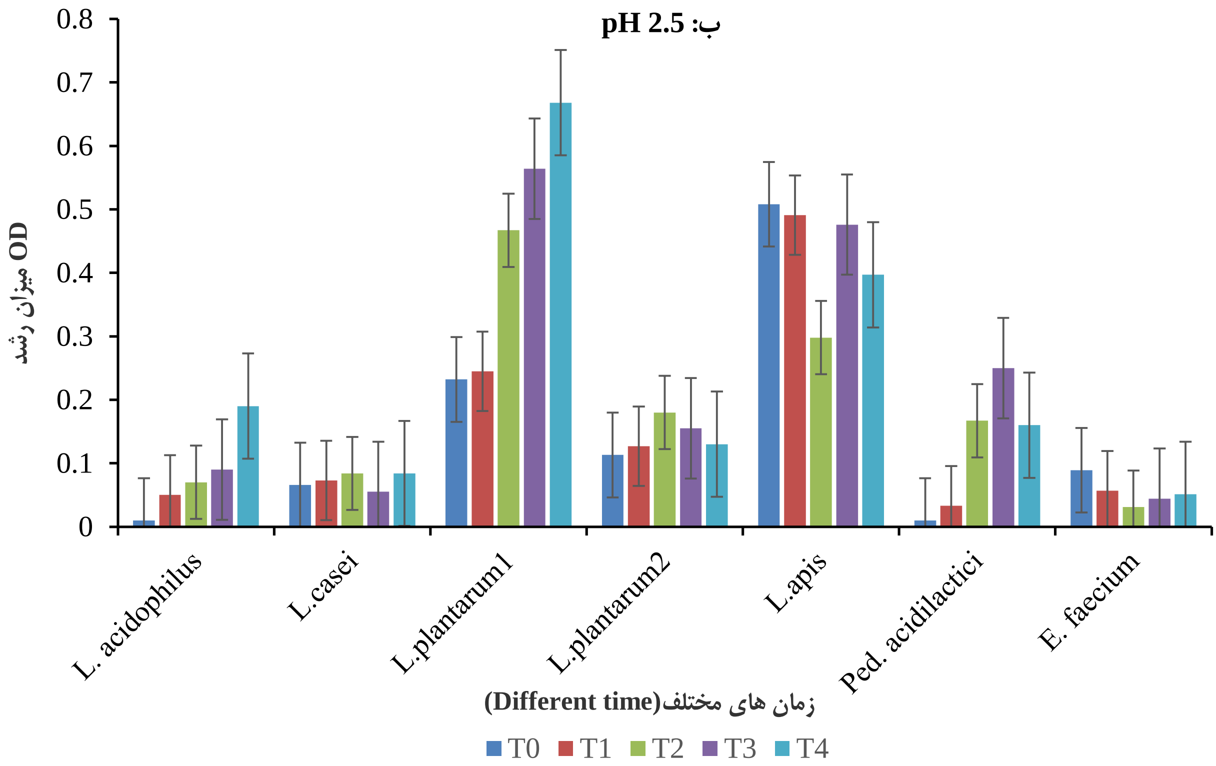
نتایج بدست آمده نشان می‌دهد که تمامی باکتری‌ها قادر به تحمل pH ۲ بودند و میزان زنده‌مانی جدایه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* ۱ و *لاکتوباسیلوس آپیس* نسبت به سایر سویه‌ها در تمامی زمان‌ها و pH ها بیشتر بود. همچنین در pH ۴ و ۶/۵ نه تنها باکتری‌ها قادر به زنده ماندن بودند، بلکه رشد خوبی هم در این شرایط داشتند. در تحقیق مشابه نیز نشان داده شده که انواع باکتری‌های اسید لاکتیکی جدا شده از گرده نان زنبور قادر به تحمل pH ۳ پس از سه ساعت بودند و میزان زنده‌مانی در حدود ۹۱/۷۱ الی ۹۹/۹۴ ٪ بود (Mohammad *et al*., 2020). در واقع زمانی که LAB در شرایط اسیدی قرار می‌گیرد، عمل هموستاز pH را با پمپ کردن H^+ به بیرون از سلول از طریق عمل $H^{+/-}$ ATPase فعال می کند (Matsumoto et al., 2004). این مورد ممکن است به عنوان عامل مقاومت اسیدی جدایه‌های LAB باشد.

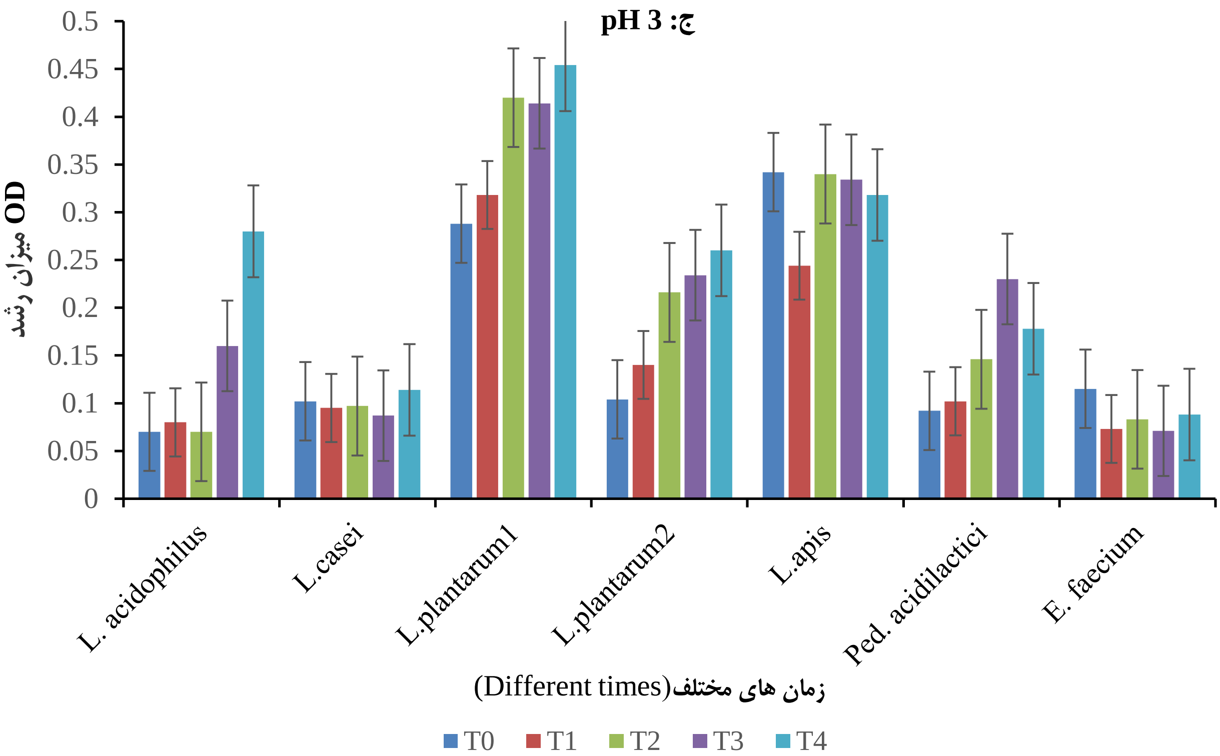


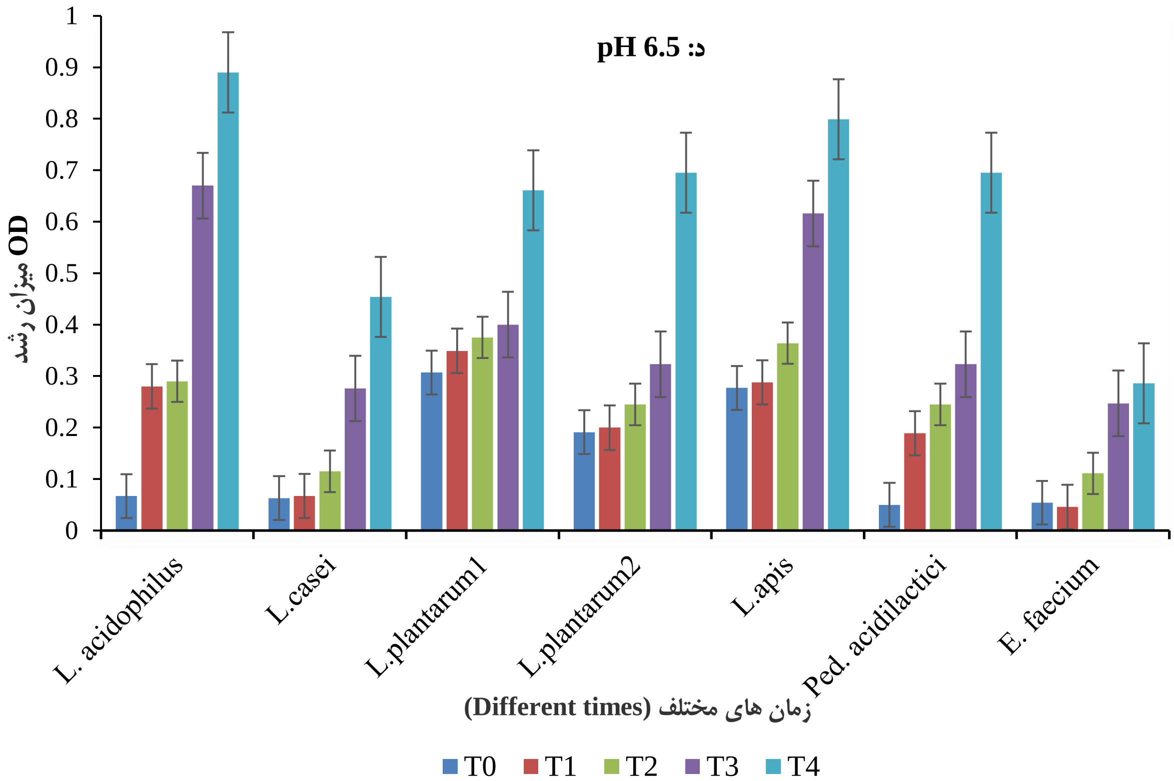
شکل ٤- الگوی PCR با پرایمر 27F/1492R و بدست آوردن باند ۱۵۰۰

Figure 4 - PCR pattern using Universal primers 27F/1492R and observing a DNA band of 1500 bp


الف: pH 2
میزان رشد OD
0.45
0.4
0.35
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
L. acidophilus
L.casei
L.plantarum1
L.plantarum2
L.apis
Ped. acidilactici
E. faecium
زمان های مختلف (Different time)
T0
T1
T2
T3
T4


ب: pH 2.5
میزان رشد OD
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
L. acidophilus
L.casei
L.plantarum1
L.plantarum2
L.apis
Ped. acidilactici
E. faecium
زمان های مختلف(Different time)
T0
T1
T2
T3
T4



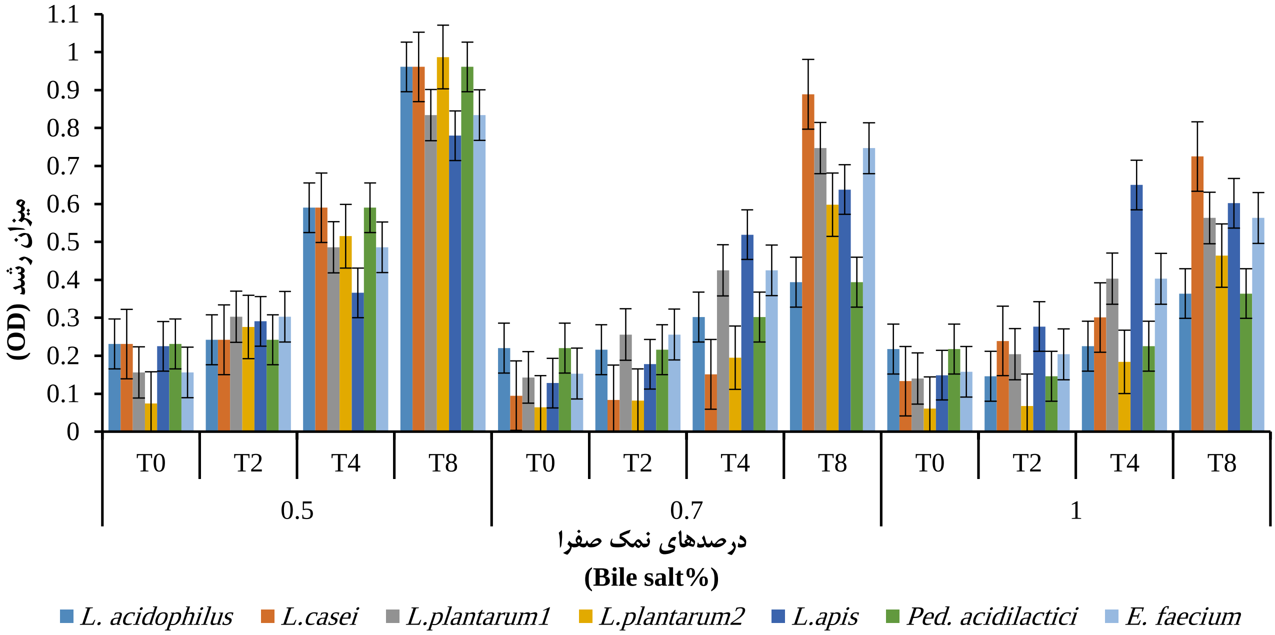


شکل ۵– مقاومت جدایه های منتخب به اسید در زمان های مختلف

Figure 5- Resistance of isolates to different pH at different time intervals

نتایج مقاومت به نمک‌های صفراوی

تحمل نمک صفراوی توسط LAB، عامل مهم و تعیین کننده دیگری در رابطه با انتخاب یک میکروارگانیسم مناسب به عنوان پروبیوتیک می‌باشد (Gibson *et al*., 2004). پروبیوتیک پس از عبور ازمعده، وارد روده شده و با نمک صفرا مواجه می‌شوند. مقاومت به صفرا در LAB ممکن است از طریق جریان نمک صفرا به خارج، هیدرولیز نمک صفرا یا تغییر غشای سلولی و دیواره سلولی صورت گیرد (Ruiz *et al*., 2013). این مکانیسم دارای اثر مثبت بر کاهش کلسترول سرم و اثر منفی بر افزایش سطح نمک‌های صفراوی دکنژوگه نیز می‌باشد (Corzo and Gilliland, 1999). کیسه صفرا نقش اساسی در مکانیسم دفاعی اختصاصی و غیر اختصاصی روده داراست و شدت اثر بازدارندگی آن به وسیله غلظت نمک‌های صفراوی تعیین می‌شود. در دستگاه گوارشی انسان میانگین غلظت نمک‌های صفراوی ۰/۳٪ وزنی/حجمی است (Pennacchia *et al*., 2004) و این غلظت برای تعیین سویه‌های مقاوم به صفرا کافی تلقی می‌شود، با این وجود در این پژوهش از غلظت‌های بالاتر نیز بهره برده شده است. نتایج نشان داد که تمامی باکتری‌ها قادر به تحمل نمک صفرا تا ۱٪ بودند (شکل ۶)، و البته میزان رشد، با افزایش غلظت نمک صفرا، کاهش یافت. همچنین جدایه‌ها نه تنها قادر به تحمل نمک صفرا بودند، بلکه رشد نیز داشتند و از میان جدایه‌ها *لاکتوباسیلوس کازئی* بیشترین میزان تحمل را داشت. در تحقیق مشابه نیز لاکتوباسیلوس پلانتاروم جدا شده از معده زنبور قادر به تحمل نمک صفرا تا ۱ درصد بود (TR, 2018). بنابر این نتایج، سویه‌های جداشده همگی دارای مقاومت بالایی نسبت به نمک صفرا نشان دادند، که می‌توانند به عنوان پروبیوتیک انسانی و حیوانی نیز استفاده شوند.



شکل ٦– مقاومت جدایه های منتخب به نمک صفرا در زمانهای مختلف

Figure 6- Resistance of isolates to bile salts at different time intervals

زنده مانی در شرایط معده‌ای و روده‌ای

پیش از آنکه یک پروبیوتیک بتواند اثرات مثبت خود را بر میزبان بروز دهد، باید قادر به تحمل شرایط خاص حاکم بر دستگاه گوارش نیز باشد. برای رسیدن به روده، سویه ها می بایست درابتدا از معده که یک سد قدرتمند در برابر ورود به روده می باشد، عبور کنند. مطالعات اولیه برای سنجش زنده مانی LAB در محیط معده ای به شناسایی سویه هایی که توانایی زنده ماندن، از میان گونه های متعدد را داشتند، اختصاص داده شد. ایجاد تنش در ساختار میکروارگانیسم به علت شرایط خاص دستگاه گوارش از دهان آغاز می‌شود. بزاق دارای آنزیم لیزوزیم، این شرایط را ایجاد می‌کند. سپس میکروارگانیسم وارد معده شده که حاوی پپسین است و pH آن از ۱/۵ تا ۳ متغیر می‌باشد. قسمت فوقانی روده نیز که حاوی آنزیم‌های پانکراسی است، میکروارگانیسم را تحت تاثیر قرار می‌دهد (Schillinger *et al*., 2005). زمان معمول عبور غذا از دستگاه گوارش متفاوت بوده اما معمولاً بین ۲۰ دقیقه تا ۳ ساعت

متفاوت است (Goldin *et al.*, 1992).

میزان زنده مانی جدایه‌های منتخب در شرایط معده‌ای و روده‌ای در جدول ۳ و ۴ نشان داده شده است. سویه های متعلق به گونه هایی که به صورت نرمال ساکن روده انسانی هستند به هنگامی که برای ارزیابی مقاومت آنها نسبت بهpH پایین و شیره معده ساختگی مورد ارزیابی قرار گرفتند، رفتار بهتری از خود نشان دادند. مطابق نتایج، *انتروکوکوس فاسیوم* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* حداقل مقاومت را نسبت به شرایط معده با درصد زنده‌مانی کمتر از ۵۰ درصد نشان داده‌اند. در مقابل، درصد زنده‌مانی این دو جدایه در شرایط روده ای با R value بالای ۱ (۱/۳۵ و ۱/۷۶) بسیار شاخص بود. پس از ۳۰ دقیقه مقاومت به شرایط معده در باکتری‌های *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، *لاکتوباسیلوس کازئی*، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* ۱ و *لاکتوباسیلوس آپیس* به طور معنی داری کمتر از سایر باکتری‌ها بود (P<۰/۰۵). به علاوه، از میان جدایه‌ها تنها مقاومت *لاکتوباسیلوس کازئی* به طور معنی داری پس از ۱۰ دقیقه کاهش یافت (P<۰/۰۵). همچنین میزان مقاومت در *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* ۲ و *لاکتوباسیلوس آپیس* پس از ۲۴ ساعت به طور معنی داری در شرایط روده افزایش نشان داد (P<۰/۰۵) . به علاوه، جدایه‌های مذکور بالاترین مقاومت را نسبت به سایر جدایه‌ها در ۲۴ ساعت از خود نشان دادند (P<۰/۰۵). جنسین و همکاران (۲۰۱۲) نیز نشان دادند که زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* پس از ۱۸۰ دقیقه در شرایط معده کاهش یافت، در حالیکه شرایط روده را به خوبی تحمل نمود (Jensen *et al.*, 2012). طبق نتایج حاصله برخی از سویه‌های جداشده مانند *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* به خوبی قادر به تحمل شرایط معده و روده بوده است و لذا می‌تواند پس از مصرف، اثرات سلامتی‌بخش خود را در بدن میزبان ارایه دهد.

جدول ۳– مقاومت جدایه‌های منتخب به شرایط ساختگی معدی (R values)

Table 3- Resistance of selected isolates in simulated gastric conditions

Time (min)	R value لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس *L. acidophilus*	لاکتوباسیلوس کازئی *L.casei*	لاکتوباسیلوس پلانتاروم ۱ *L.plantarum1*	لاکتوباسیلوس پلانتاروم ۲ *L.plantarum2*	لاکتوباسیلوس آپیس *L.apis*	پدیوکوکوس اسیدی لاکتیسی *Ped. Acidilactici*	انتروکوکوس فاسیوم *E. faecium*
0	0.92±0.15^{aA}	0.89±0.12^{bA}	0.82±0.29^{aA}	0.94±0.11^{aA}	0.87±0.31^{aA}	0.93±0.11^{aA}	0.91±0.30^{aA}
10	0.72±0.13^{aA}	0.60±0.16^{abA}	0.62±0.16^{aA}	0.91±0.29^{aA}	0.51±0.18^{aA}	0.94±0.11^{aA}	0.92±0.19^{aA}
20	0.59±0.16^{aAB}	0.20±0.05^{aA}	0.45±0.12^{aAB}	0.84±0.18^{aB}	0.28±0.09^{aA}	0.91±0.26^{aB}	0.86±0.12^{aB}
30	0.68±0.13^{aABC}	0.31±0.19^{aA}	0.51±0.12^{aAB}	1.14±0.25^{aC}	0.24±0.12^{aA}	0.87±0.16^{aBC}	0.83±0.18^{aBC}

حروف بزرگ و کوچک به ترتیب نشاندهنده تفاوت معنی دار در ردیف و ستون می‌باشد (P<۰/۰۵)

جدول ٤– مقاومت جدایه های منتخب به شرایط ساختگی روده فوقانی (R values)

Table 4- Resistance of selected isolates in simulated intestinal conditions

Time (h)	R value لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس *L. acidophilus*	لاکتوباسیلوس کازئی *L.casei*	لاکتوباسیلوس پلانتاروم ۱ *L.plantarum1*	لاکتوباسیلوس پلانتاروم ۲ *L.plantarum2*	لاکتوباسیلوس آپیس *L.apis*	پدیوکوکوس اسیدی لاکتیسی *Ped. Acidilactici*	انتروکوکوس فاسیوم *E. faecium*
0	0.84±0.21^{aA}	0.91± 0.25^{aA}	0.92±0.12^{aA}	0.92±0.25^{abA}	0.91±0.26^{aA}	0.90±0.19±^{aA}	0.8±0.31^{aA}
4	0.81±0.15^{aA}	0.95±0.22^{aA}	0.94±0.18^{aA}	0.91±0.29^{aA}	0.87±0.16^{aA}	0.93±0.24^{aA}	0.81±0.21^{aA}
8	0.97±0.22^{aA}	0.97±0.32^{aA}	0.99±0.32^{aA}	0.97±0.16^{abA}	0.89±0.28^{aA}	0.96±0.12^{aA}	0.85±0.19^{aA}
12	1.26±0.19^{abA}	1.11±0.26^{aA}	1.21±0.26^{aA}	1.38±0.16^{abA}	1.42±0.25^{abA}	1.11±0.19^{aA}	0.92±0.14^{aA}
24	1.60±0.28^{bBC}	1.35±0.21^{aABC}	1.23±0.18^{aAB}	1.52±0.21^{bABC}	1.76±0.19^{bC}	1.14±0.15^{aAB}	1.01±0.19^{aA}

حروف بزرگ و کوچک به ترتیب نشاندهنده تفاوت معنی دار در ستون و ردیف می‌باشد (**P**<۰/۰۵)

نتایج خصوصیات تجمعی، کمک تجمعی و آب‌گریزی سویه-ها

مقادیر مربوط به درصد آبگریزی، تجمعی و کمک تجمعی باکتری ها در جدول ۵ نشان داده شده است. طبق نتایج بدست آمده، اختلاف معنی دار بین جدایه‌ها در این سه ویژگی مشاهده نشد، و البته دو جدایه لاکتوباسیلوس کازئی و پدیوکوکوس اسیدی لاکتسی به ترتیب بیشترین (۸۴٪) و کمترین میزان (۴۶٪) درصد تجمعی را داشتند. در تحقیق مشابه نیز لاکتوباسیلوس ها دارای خاصیت خود تجمعی بالا (٪ ۹۹/۸) گزارش شده اند (۴۱-۴۰).

جدول ۵ نتایج مربوط به میزان آبگریزی، تجمعی و کمک تجمعی جدایه ها

Table 5- Results related to auto-aggregation, co-aggregation and hydrophobicity of isolates

نام باکتری	درصد تجمعی Auto aggregation %	درصد کمک تجمعی Co-aggregation %	درصد آبگریزی Hydrophobicity%
لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس *L. acidophilus*	60.65±25.31[a]	13.34±9.21[a]	54.75±21.56[a]
لاکتوباسیلوس کازئی *L.casei*	84.91±30.15[a]	15.66±8.23[a]	68.43±23.18[a]
لاکتوباسیلوس پلانتاروم ۱ *L.plantarum1*	55.87±12.34[a]	16.32±10.12[a]	59.28±34.18[a]
لاکتوباسیلوس پلانتاروم ۲ *L.plantarum2*	55.19±21.34[a]	17.28±8.32[a]	59.17±29.14[a]
لاکتوباسیلوس آپیس *L.apis*	74.49±34.45[a]	22.76±12.19[a]	65.37±34.15[a]
پدیوکوکوس اسیدی لاکتیسی *Ped. acidilactici*	46.91±17.36[a]	10.81±6.18[a]	43.21±20.15[a]
انتروکوکوس فاسیوم *E. faecium*	69.89±34.24[a]	14.42±7.12[a]	66.26±32.18[a]

[a,b] حروف کوچک نشاندهنده تفاوت معنی دار در ستون می‌باشد (P<۰/۰۵)

Small alphabetical letters in the column shows significant differences between isolates (p ≤ 0.05)

تجمعی و آبگریزی به عنوان شاخص‌های مناسب برای بررسی توانایی اتصال به دیواره سلول در محیط آزمایشگاهی می‌باشند. همچنین همبستگی مثبتی که بین آبگریزی، تجمعی و توانایی سویه‌ها در اتصال به دیواره روده و همین‌طور کمک تجمعی وجود دارد، به‌عنوان بررسی‌های اولیه انتخاب یک سویه مناسب برای پروبیوتیک قابل اعتماد، ضروری به‌نظر می‌رسد (Dunne et al., 2001; Del *et al.,* 2000; Xu *et al.,* 2009). گزارش شده است که کمک تجمعی سبب جلوگیری از رشد و اتصال سویه‌های بیماری‌زا در دستگاه گوارش می-شود (Botes et al., 2008). همچنین ثابت شده است که باکتری‌های مورد استفاده به عنوان پروبیوتیک شرایط را به گونه‌ای کنترل می‌کنند که سبب افزایش غلظت ترکیبات ضد میکروبی در اطراف پاتوژن‌ها شده و این عمل در اثر کمک تجمعی افزایش می‌یابد (Kaewnopparat *et al.,* 2013).

فاکتورهایی مثل پروتئین، گلیکوپروتئین، تیکوئیک اسید و لیپوتیکوئیک اسیدها در سطح دیواره سلولی باکتری‌ها نیز در اتصال به دیواره روده، تجمعی و آبگریزی سویه‌ها موثر هستند (Ramiah *et al.,* 2008). اتصال باکتری‌ها به دیواره سلولی روندی پیچیده بوده و شامل پیوندهای اختصاصی و غیر اختصاصی و وجود رسپتورهای خاص می-باشد. بررسی‌ها نشان می‌دهد پروتئین‌های لایه S سطح دیواره سلولی باکتری نقش مهم و اساسی در خاصیت تجمعی سویه‌ها ایفا می‌کند (Li *et al.,* 2015). از طرف دیگر درصد بالای آبگریزی نیز خود می-تواند نشانه‌ای از ظرفیت بالای باکتری برای اتصال به اپی‌تلیال روده باشد (Rosenberg et al., 1980). علاوه بر این، بار سطحی و آبگریزی باکتری‌ها تحت تاثیر شرایط محیطی است که در آن قرار می‌گیرند، که نشاندهنده آن است که چرا سویه‌های مختلف رفتار متفاوتی از خود نشان می‌دهند (Merghni et al., 2014; Vesterlund *et al.,* 2005). در مطالعه حاضر در صد تجمعی و آبگریزی بالا جدایه ها نشانگر توانایی اتصال بالا این جدایه ها به دیواره سلول اپتلیال روده می باشد .

نتیجه گیری کلی

از مهمترین باکتری‌های همزیست دستگاه گوارش زنبورهای عسل باکتری‌های اسید لاکتیک می‌باشند. در این تحقیق نیز حضور باکتری های اسید لاکتیک در دستگاه گوارش زنبور عسل نشان داده شد. این باکتری ها بیانگر خصوصیات پروبیوتیکی بودند که اهمیت زیادی در سلامتی میزبان دارند. همانطور که در نتایج مشاهده شد این باکتری‌ها با تولید اسید لاکتیک می توانند مانع از رشد باکتری‌های مضر شوند. بنابراین در حفظ سلامت دستگاه گوارش زنبورعسل می توانند نقش مهمی ایفا کنند. البته قبل از ثبت این جدایه ها بعنوان پروبیوتیک لازم است ویژگی آنها در شرایط درون تنی نیز بررسی و اثرات سلامتی بخش و ایمنی آنها تایید شود. همچنین پیشنهاد می گردد عملکرد این باکتری ها در بهبود سیستم ایمنی و اثرات ضد میکروبی جدایه ها علیه عوامل انواع بیماری های زنبور عسل نیز بررسی گردد.

Refrences

1. Audisio, M., M. Torres, D. Sabate, C. Ibarguren, and M. Apella. 2011. Properties of different lactic acid bacteria isolated from Apis mellifera L. beegut. Microbiological Research,166:1-13.
2. Axelsson, L., and S. Ahrné. 2000. Lactic acid bacteria. In Applied microbial systematics, Pages 367-388 Springer, Dordrecht.
3. Beumer, R. R., J. de Vries, and F. M. Rombouts. 1992. *Campylobacter jejuni* non-culturable coccoid cells. International Journal of Food Microbiology,15:153-163.
4. Botes, M., B. Loss, C. A. Van Reenen, and L. M. Dicks. 2008. Adhesion of the probiotic strains *Entrococcus mundtii* ST4SA and *L. plantarum* 423 to Caco-2 cells under condition simulating the intestinal tract, and in the presence of antibiotics and anti-inflammatory medicaments. Archive of Microbiology, 190: 573- 584.
5. Charteris, W. P., P. M. Kelly, L. Morelli, and J. K. Collins. 1998. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *lactobacillus* species. Journal of Food Protection, 61: 1636- 1643.
6. Corzo, G., and S. E. Gilliland. 1999. Bile salt hydrolase activity of three strains of *lactobacillus acidophilus*. Journal of Dairy Science, 82: 472- 480.
7. Del Re, B., B. Sgorbati, M. Miglioli, and D. Palenzona. 2000. Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of Bifidobacterium longum. Letters in applied microbiology, 31(6):438-42
8. Dunne, C., L. O'mahony, L. Murphy, G. Thornton, D. Morrissey, S. O'Halloran, M. Feeney, and S.Flynn. 2001. *In vitro* selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with *In Vivo* findings. American Journal of Clinical Nutrition, 73: 386- 392.
9. El-Sohaimy, A. A., S. H. D. Masry, M. G. Shehata, S. N. Al-Kahtani, T. E. Abdelwahab, Y. A. T. Abdelmotaleb, and M. E. Nour. 2020. Isolation, Identification and Antimicrobial Activity of Unprecedented LAB Isolates from Honeybees. Pakistan Journal of Biological Sciences: PJBS, 23(4): 467-477.
10. Elzeini, H. M., Abdel Rhman A. A. Ali, N. F. Nasr, Y. E. Elenany, and A. A. M. Hassan. 2020. Isolation and identification of LAB from the intestinal tracts of honey bees, Apis mellifera L., in Egypt. Journal of Apicultural Research,60: 1-9.
11. FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Meeting. 2001. Safety evaluation of certain mycotoxins in food (No. 74). Food & Agriculture Organization.
12. Felis, G. E., A. Deriu, P. Molicotti, L. A. Sechi, F. Dellaglio, and S. Zanetti. 2007. Identification and functional characterization of *Lactobacillus* strains isolated from milk. International Dairy Journal, 17:1312-1320
13. Gheisari, A., and M. Behjatian Esfahani. 2015. Effect of feeding different of acetic acid, probiotic, oxytetracycline and neomycin on populations of coliform and lactobacillus in pupae of honey bee (Apismelliferal). Biological Journal of Microbiology, 4(14):93-100. (In Persian)
14. Gibson, G. R., H. M. Probert Van Loo J, R. A. Rastall, and M. B. Roberfroid. 2004. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. Nutrition research reviews, 17(02):259-75.
15. Gilliam, M., and D. B. Prest. 1987. Microbiology of feces of the larval honey bee, Apis mellifera. Journal of Invertebrate Pathology, 49:70–75
16. Goldin, B., S. Gorbach, M. Saxelin, S. Barakat, L. Gualtieri, and S. Salminen. 1992. Survival of *Lactobacillus* speices (Strain GG) in human gastrointestinal tract. Digestive Diciplinary Science, 37: 121- 128
17. Jensen, H., S. Grimmer, K. Naterstad, and L. Axelsson. 2012. In vitro testing of commercial and potential probiotic lactic acid bacteria. International journal of food microbiology, 153(1-2): 216-222.
18. Kaewnopparat, S., N. Dangmanee, N. Kaewnopparat, T. Srichana, M. chulasiri, and S. Settharaksa. 2013. *In vitro* probiotic properties of *L.fermentum* SK5 isolated from vagina of healthy woman. Anaerobic, 22: 6- 13
19. Kandler, O. and N. Weiss. 1986. Genus Lactobacillus Beijerinck 1901. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2. ed. Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. and Holt, J.G. Pages 1209– 1234. Baltimore: Williams and Wilkins.
20. Kos, B., J. Šušković, S. Vuković, M. Šimpraga, J. Frece, and S. Matošić. 2003. Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. Journal of applied microbiology, 94(6):981-7
21. Lane, J. G., B. Bladon, D. R. M. Little, J. R. J. Naylor, and S. H. Franklin. 2006. Dynamic obstructions of the equine upper respiratory tract. Part 1: observations during high‐speed treadmill endoscopy of 600 Thoroughbred racehorses. Equine veterinary journal, 38(5): 393-399.
22. Li, Q., Z. Liu, M. Dong, J. Zhou, and Y. Wang. 2015. Aggregation and adhesion abilities of 18 *LAB* isolated from traditional fermented food. International Journal of Agriculture Policy and Research, 3 (2): 84- 92
23. Liong, M. T., and N. P. Shah. 2005. Acid and bile tolerance and cholesterol removal ability of lactobacilli strains. Journal of Dairy Science, 88(1): 55–66. https://doi.org/10.3168/jds.
24. Matsumoto, M., H. Ohishi, and Y. Benno. 2004. Hþ-ATPase activity in Bifidobacterium with special reference to acid tolerance. International Journal of Food Microbiology, 93(1): 109–113.
25. Merghni, A., N. Leban, A. Behi, and A. Bakjrouf. 2014. Evaluation of the probiotic properties of *Bacillus* spp. strains isolated from Tunisian hypersaline environments. African Journal of Microbiology Research, 8(4): 398- 405.

26. Mohammad, S. M., N. K. Mahmud-Ab-Rashid, and N. Zawawi. 2020. Probiotic properties of bacteria isolated from bee bread of stingless bee Heterotrigona itama. Journal of Apicultural Research, 1-16.
27. Naidu, A. S., W. R. Bidlack, and R. A. Clemens. 1999. Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 39:13–26.
28. Nikooei, M., C. H. Hemmati, and S. Parichehreh. 2018. Natural strategies for the control of *P.larvae*, the causative agent of American foulbrood in honey bees. Iranian honey bee science and technology, 9: 2-11.
29. O'Bryan, C. A., P. G. Crandall, S. C. Ricke, and J. B. Ndahetuye. 2014. Lactic acid bacteria (LAB) as antimicrobials in food products: Types and mechanisms of action. In Handbook of natural antimicrobials for food safety and quality. Pages 117–136. Woodhead Publishing
30. Olofsson, T. C., A. Vásquez, D. Sammataro, and J. Macharia. 2011. A scientific note on the lactic acid bacterial flora within the honeybee subspecies; *Apis mellifera* (Buckfast), *A. m. scutellata*, *A. m. mellifera*, and *A. m. monticola*. Apidologie 1–4.
31. Pennacchia, C., D. Ercolini, G. Blaiotta, O. Pepe, G. Mauriello, and F. Villani. 2004. Selection of Lactobacillus strains from fermented sausages for their potential use as probiotics. Meat Science, 67: 309–317.
32. Ramiah, K., C. A. Van Reenen, and L. M. Dicks. 2008. Surface-bund proteins of *Lactobacillus plantarum* 423 that contribute to adhesion of Caco-2 cells and their role in competitive exclusion and displacement of *Clostridium sporogenes* and *Entrococcus faecalis*. Journal of Research Microbiology, 159(6): 470- 475.
33. Ripamonti, B., A. Aggazi, C. Bersani, C. Pecorini, and S. Pirani. 2011. Screening of species-specific lactic acid bacteria for veal calves multi-strain probiotic adjuncts. An aerobe, 17(3): 97-105.
34. Rosenberg, B., D. Gutnik, and E. Rosenberg. 1980. Adherence of bacteria to hydrocarbons: A simple method for measuring cell surface hydrophobicity. FEMS microbiology letters, 9 (1): 28- 33.
35. Ruiz, L., A. Margolles, and B. Sanchez. 2013. Bile resistance mechanisms in Lactobacillus and Bifidobacterium. Frontiers in Microbiology, 4(396): 396–398.
36. Sabaté, D. C., M. S. Cruz, M. R. Benítez-Ahrendts, and M. C. Audisio. 2012. Beneficial effects of B.subtilis subsp. subtilis Mori2, a honey-associated strain, on honeybee colony performance. Probiotics and antimicrobial proteins, 4(1): 39-46.
37. Schillinger, U., C. Guigas, and W. H. Holzapfel. 2005. In vitro adherence and other properties of lactobacilli in probiotic yoghurt-like products. International Dairy Journal, 15: 1289-1297.
38. Sjovall, J. 1959. Dietary glycin and taurine on bile acid conjugation in man; bile acids and steroids 75. Proceeding of the Society for Experimental Biological Medicine, 100: 676- 678
39. Tajabadi, N., M. Mardan, M. Y. A. Manap, M. Shuhaimi, A. Meimandipour, and L. Nateghi. 2011. Detection and identification of Lactobacillus bacteria found in the honey stomach of the giant honeybee Apis dorsata. Apidologie, 42: 642.946
40. Tokatlı, M., G. Gülgör, S. Bağder Elmacı, N. Arslankoz İşleyen, and F. Özçelik. 2015. In vitro properties of potential probiotic indigenous lactic acid bacteria originating from traditional pickles. BioMed research international, 2015:1-9
41. TR, K. 2018. Probiotic potency of Lactobacillus plantarum KX519413 and KX519414 isolated from honey bee gut. FEMS microbiology letters, 365(4): fnx285.
42. Vasquez, A., and T. C. Olofsson. 2009. The lactic acid bacteria involved in the production of bee pollen and bee bread. Journal of Apicultural Research, 48:189–195
43. Vásquez, A., E. Forsgren, I. Fries, R. J. Paxton, E. Flaberg, L. Szekely, and T. C. Olofsson. 2012. Symbionts as major modulators of insect health: lactic acid bacteria and honeybees. PloS one, 7(3): e33188.
44. Vesterlund, S., J. Paltta, M. Karp, and A. C. Ouwehand 2005. Adhesion of bacteria to resected human colonic tissue: quantitative analysis of bacterial adhesion and viability. Research Microbiology, 156: 238- 244.
45. Xu, H., H. S. Jeong, H. Y. Lee, and J. Ahn. 2009. Assessment of cell surface properties and adhesion potential of selected probiotic strains. Journal of Letter Applied Microbiology, 49: 434- 442.